Über einige optisch-aktive Polypeptide des Isoleucins.

Ein Beitrag
zur Kenntnis der Waldenschen Umkehrung.

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

GENEHMIGT

VON DER PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT

DER

FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT

ZU BERLIN.

ACAD.
LEIDENSIS
BIBL.

Von

Paul Hirsch

aus Wiesbaden.

Tag der Promotion: 14. Januar 1911.

101

Referenten:

Professor Dr. **Gabriel.**

Professor Dr. **Nernst.**

Universitäts-Buchdruckerei von Gustav Schade (Otto Francke) in Berlin N 24.
Linienstraße 158.

Meinem lieben Vater.

Inhaltsverzeichnis.

Seite

A. Theoretischer Teil 7
B. Experimenteller Teil 23
I. Darstellung des dl-Isoleucins 23
II. Spaltung des dl-Isoleucins in seine optisch-aktiven Komponenten 27
III. Versuche über die Waldensche Umkehrung bei Isoleucin 29
IV. Polypeptide des dl-Isoleucins 35
V. Optisch-aktive Polypeptide des d-Isoleucins . 37
1. d-Isoleucylglycin 37
2. l-Leucyl-d-isoleucin 37
3. d-Alanyl-l-leucyl-d-isoleucin 42
4. Glycyl-d-alanyl-l-leucyl-d-isoleucin . . 45
VI. Versuche über Spaltung der optisch-aktiven Polypeptide mit Hefepreßsaft 49

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535712_0212

A. Theoretischer Teil.

Schon bei der totalen Hydrolyse von Proteinen, speziell bei der Hydrolyse von Casein durch Emil Fischer[1]), sind bei der Trennung der sogenannten Leucinfraktion große Schwierigkeiten entstanden. Emil Fischer fand für die in Betracht kommenden einzelnen Kristallfraktionen wohl auf die Aminocapronsäure stimmende Analysenzahlen, doch eine für Leucin viel zu hohe spezifische Drehung. Er vermutete schon damals eine dem Leucin isomere, aber viel stärker drehende, noch unbekannte Aminosäure, deren Isolierung jedoch nicht gelang.

In noch größerem Maße bestehen diese Schwierigkeiten bei der partiellen Hydrolyse der Proteine. So wurde beispielsweise von Emil Abderhalden aus Edestin eine Verbindung isoliert, an deren Aufbau nur Leucin und Glykokoll beteiligt sind. Die Analysenzahlen und das Molekulargewicht deuten auf ein Dipeptid. Der Körper wurde in der Form seines Anhydrides isoliert. Seine Eigenschaften — Drehungsvermögen und Kristallisation — stimmen jedoch mit denjenigen des l-Leucylglycinanhydrides nicht überein. Es lag auch hier die Vermutung nahe, daß an dem Aufbau des isolierten Anhydrides eine dem Leucin isomere Aminosäure beteiligt war.

[1]) Emil Fischer, Über die Hydrolyse des Caseins mit Salzsäure. Zeitschr. f. physiol. Chemie **33**, 161 (1901).

Da nun im Jahre 1904 von Felix Ehrlich[2]) ein natürliches Isomere des Leucins in dem von ihm Isoleucin genannten Körper entdeckt wurde, so lag es auf der Hand, eine Identität der von Fischer und Abderhalden vermuteten Aminosäure mit dem Isoleucin anzunehmen. Diese Vermutung erhielt auch ihre Bestätigung; bei dem aus Edestin isolierten Anhydrid gelang es, mit Sicherheit Isoleucin nachzuweisen. Da nun auch bei der partiellen Hydrolyse von anderen Proteinen noch vermutlich Isoleucin enthaltende Spaltungsprodukte von Abderhalden aufgefunden wurden, so mußten, um diese Frage zu lösen, zuerst Isoleucin enthaltende Polypeptide dargestellt werden.

Da nun die von Ehrlich[3]) einerseits und Friedmann und Brasch[4]) andererseits unabhängig voneinander ausgeführte und beschriebene Synthese von Isoleucin nach der Malonsäuresynthese Emil Fischers erlaubte, genügendes Material darzustellen, so habe ich auf Veranlassung von Herrn Prof. Dr. Emil Abderhalden einige Derivate des Isoleucins dargestellt. Daneben wurde auch das Verhalten des Isoleucins bei der Waldenschen Umkehrung studiert.

Felix Ehrlich[5]) gelang es im Jahre 1904, aus den Abfällen der Zuckerindustrie, den Strontianentzuckerungslaugen, d-Isoleucin zu isolieren. Er

---

[2]) Felix Ehrlich, Über den neuen optisch-aktiven Nichtzucker, das Isoleucin. Zeitschr. d. Vereins d. Zuckerindustrie **54**, 975 (1904). — Über die Entstehung des Fuselöls. Ibid. **55**, 892 (1905). — Über das natürliche Isomere des Leucins. Berichte d. deutsch. chem. Gesellsch. **37**, 1809 (1904).

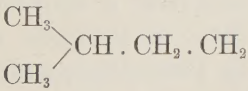
[3]) Felix Ehrlich, Über eine Synthese des Isoleucins. Berichte d. deutsch. chem. Gesellsch. **41**, 1453 (1908).

[4]) Brasch und Friedmann, Eine neue Synthese des Isoleucins. Beitr. z. chem. Physiologie u. Pathologie **9**, 376 (1908).

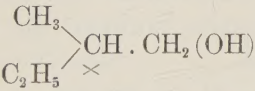
[5]) Felix Ehrlich, Über den neuen optisch-aktiven Nichtzucker, das Isoleucin. Zeitschr. d. Vereins f. Zuckerindustrie **54**, 975 (1904).

untersuchte diese Laugen auf stickstoffhaltige Produkte. Die Strontianmelasseschlempe wurde nach Trocknen mit Alkohol und wässerigem Ammoniak geschüttelt. Der Leucin enthaltende ammoniakalisch-alkoholische Extrakt wurde eingeengt und bei niedriger Temperatur zur Kristallisation stehen gelassen. Die Kristalle wurden nach Absaugen in Wasser gelöst, mit Kupferoxydaufschlämmung gekocht, das überschüssige Kupferoxyd abfiltriert und das Filtrat im Vakuum zur Trockne verdampft. Da nun Versuche ergaben, daß ein Teil des Kupfersalzes in Methylalkohol löslich war, so wurde dieses Verfahren zur Trennung benutzt. Durch Behandeln der wässerigen Lösung des in Äthylalkohol löslichen Kupfersalzes mit Schwefelwasserstoff erhielt Felix Ehrlich die neue Aminosäure, das Isoleucin. Die Elementaranalyse ließ es als eine Aminocapronsäure erkennen; seine Kristallform ist der des Leucins sehr ähnlich, dagegen sein Drehungsvermögen viel größer als das des Leucins.

Es war nun die Aufgabe, die Struktur des Isoleucins aufzuklären, und hier fußen die Versuche Ehrlichs auf seinen Beobachtungen über die in der Natur vorkommenden Fuselöle[6]). Genau die gleiche Tendenz des gemeinschaftlichen Vorkommens wie Leucin und Isoleucin zeigen der inaktive Isoamylalkohol



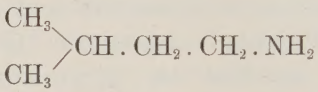
und der aktive d-Amylalkohol



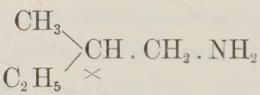
[6]) Felix Ehrlich, Über die Entstehung des Fuselöls. Siehe Anmerkung 2.

Ferner boten die durch Erhitzen von Leucin und Isoleucin erhaltenen Amylamine, das aus d-Isoleucin erhaltene d-Amylamin und das aus l-Leucin dargestellte inaktive Isoamylamin, wichtige Vergleichs- und Anhaltspunkte für die Struktur des Isoleucins.

Schwanert[7]) hat die Bildung von optisch-inaktivem Isoamylamin



bei der trockenen Destillation von Leucin beobachtet. Unter gleichen Versuchsbedingungen erhielt Ehrlich aus d-Isoleucin ein optisch-aktives Amylamin, das sich mit dem von Marckwald[8]) dargestellten d-Amylamin



identisch zeigte.

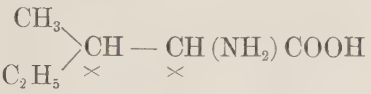
Neben dem d-Amylamin erhielt Ehrlich noch einen in Nadeln kristallisierenden Körper $C_{12}H_{12}N_2O_2$, der dem Leucinimid isomer ist und als Isoleucinimid, ein Diketopiperazin, anzusprechen ist.

Da ferner Ehrlich aus d-Isoleucin durch Vergärung mit Zucker und Hefe d-Amylalkohol erhalten konnte, so ließen diese Reaktionen im Verein mit der Tatsache, daß die Phenylisocyanatverbindung ein Hydantoinderivat liefert, den Schluß zu, daß in dem d-Isoleucin eine α-Aminosäure mit zwei asymmetrischen Kohlenstoffatomen vorliegt, die mit einer der

[7]) Schwanert, Ann. d. Chemie **102**, 225.

[8]) Marckwald, Berichte d. deutsch. chem. Gesellsch. **37**, 1047 (1904).

nach der van't Hoffschen Formel möglichen vier optisch-aktiven Modifikationen der α-Amino-β-methyl-β-äthylpropionsäure

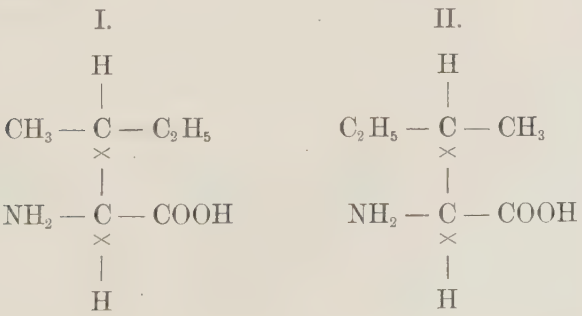


identisch ist.

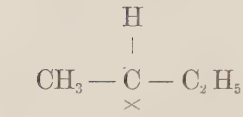
Einen endgültigen Beweis konnte natürlich erst die Synthese der Aminosäure liefern. Auch dieser Beweis gelang Ehrlich.

Seine erste Synthese des d-Isoleucins führte er mit α'-Amylalkohol aus, den er in den d-Valeraldehyd überführte. Durch Anlagerung von Blausäure und Ammoniak mit Hilfe der bereits von Emil Fischer zur Leucindarstellung benutzten Cyanhydrinmethode an d-Valeraldehyd und Verseifung des erhaltenen Valeroamidonitrils erhielt Ehrlich eine dem Isoleucin identische Aminosäure.

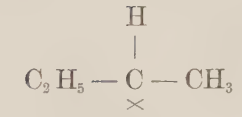
Allerdings sind hier kleine Einschränkungen zu machen, denn wir haben es in dem Isoleucin mit einer zwei asymmetrische Kohlenstoffatome besitzenden Aminosäure zu tun, die zwei Razemkörper und mithin vier optische Antipoden, von denen allerdings je zwei Totalisomere sind, liefert.

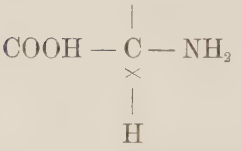


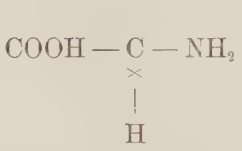
III.



IV.







I und II können Razemate bilden.
III - IV - - -

I und II sollen angenommen dem Isoleucin, eine dieser beiden Formeln dem d-Isoleucin entsprechen. III und IV entsprèchen dann einem Totalisomeren des Isoleucins, dem von Ehrlich Alloisoleucin genannten Körper.

Bei der Synthese über das Valeroamidonitril entstand nur ein Körper, der nicht genau konstanten Schmelzpunkt zeigte und je nach der Art des Umkristallisierens schwächer oder stärker links drehende oder auch rechts drehende Fraktionen lieferte. Genauere Untersuchungen ergaben nun, daß in der Tat das synthetische Produkt aus zwei stereoisomeren Aminosäuren besteht, und man konnte es in ungefähr zwei gleiche Teile d-Isoleucin und d'-Alloisoleucin zerlegen.

Nach einem Vorschlag Emil Fischers nannte Ehrlich den Körper d'-Alloisoleucin, da er im Gegensatz zu seiner Konfiguration nach links drehte.

Ehrlich denkt sich das d'-Alloisoleucin bei der Synthese des d-Isoleucins durch sterische Umlagerung entstanden. Er konnte aus seinem d-Isoleucin durch Behandlung mit Barythydrat im Autoklaven unter Druck und Vergärung des nicht umgewandelten d-Isoleucins reines d'-Alloisoleucin darstellen.

Seine zweite Synthese des Isoleucins führte Ehrlich mit Hilfe der Malonsäuresynthese (Emil Fischer) aus.

Durch Kupplung von sekundärem Butyljodid mit Natriummalonester und Bromieren der erhaltenen sekundären Butylmalonsäure stellte er die sekundäre Brombutylmalonsäure dar. Diese lieferte beim Erhitzen im Vakuum durch Carboxylabspaltung die α-Brom-β-methyl-β-äthylpropionsäure, die beim Amidieren mit wässerigem Ammoniak in die entsprechende α-Aminosäure, das Isoleucin, überging.

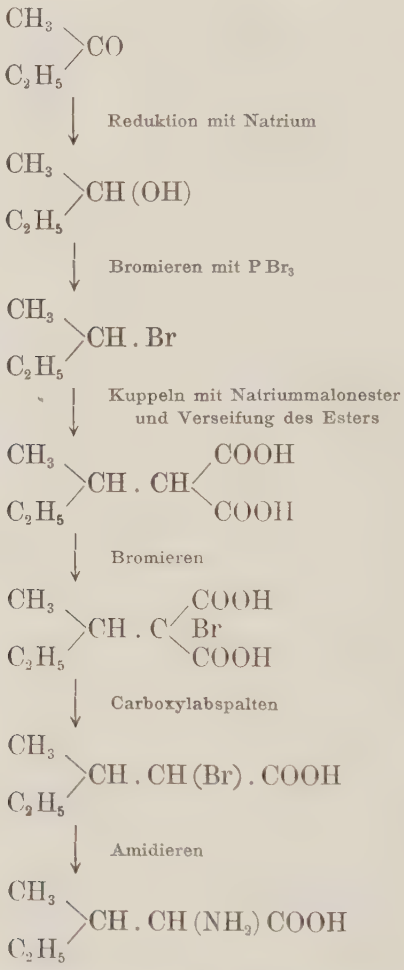
Fast zu gleicher Zeit veröffentlichten Friedmann und Brasch ihre genau gleiche Synthese des Isoleucins.

Ehrlich sowohl als Friedmann und Brasch fanden ihre Hauptschwierigkeit in dem schlechten Kristallisationsvermögen der sekundären Butylmalonsäure und der sekundären Brombutylmalonsäure.

Ich habe mich bei der Darstellung des Isoleucins für meine weiteren Untersuchungen fast genau an diese beiden Arbeiten gehalten. Nur ging ich nicht von dem sekundären Butyljodid aus, sondern stellte mir das sekundäre Butylbromid aus sekundärem Butylalkohol und diesen aus Methyläthylketon selbst dar.

Besonderes Gewicht legte ich auf die Gewinnung der sekundären Butylmalonsäure und deren Bromkörper in kristallisierter Form, da es sich herausstellte, daß die Ausbeuten an sekundärer Brombutylmalonsäure und an der α-Brom-β-methyl-β-äthylpropionsäure viel besser ausfielen, wenn ich mit kristallisierten Körpern arbeitete. Durch kleine, im experimentellen Teil beschriebene Maßnahmen ließen sich in beiden Fällen immer und sehr leicht Kristalle erhalten.

Es verlief demnach die ganze Synthese nach folgendem Schema:



Das Isoleucin wurde in razemischer Form erhalten. Zur Spaltung in seine optisch-aktiven Komponenten wurde es erst nach E. Fischer und

O. Warburgs Methode[9]), die bereits von R. Locquin[10]) zur Spaltung des Isoleucins benutzt worden war, in seine Formylverbindung übergeführt. Auch hierbei verbesserte eine im experimentellen Teil beschriebene kleine Abänderung die Ausbeute. Die Trennung erfolgte dann mit Hilfe der Brucinsalze; das Brucinsalz des Formyl-l-isoleucins kristallisierte aus der alkoholischen Lösung aus, während das des d-Isoleucins in Lösung blieb. Die zu einigen Versuchen notwendige Abspaltung des Formylrestes wurde nach der Vorschrift von Fischer und Warburg vorgenommen.

Bei der Darstellung von Isoleucin beobachtete ich mehrmals ein Auftreten von Isoleucin in großen derben Kristallen, die eine viel geringere Löslichkeit (1 : 20) in Wasser im Gegensatz zur gewöhnlichen Löslichkeit (1 : 10) hatten. Die Kristalle behielten diese Eigenschaft auch beim häufigen Umkristallisieren bei. Auch beim Amidieren der α-Brom-β-methyl-β-äthylpropionsäure unter Druck im Schießrohr erhielt ich schwer lösliches Isoleucin.

Die Phenylisocyanatverbindung und das Hydantoinderivat dieses schwer löslichen Isoleucins zeigten nur einen um wenige Grad verschiedenen Schmelzpunkt von der des leichter löslichen Isoleucins.

Ob wir es hier mit einer besonderen Modifikation des Isoleucins zu tun haben, konnte ich nicht feststellen. Alloisoleucin, das ja bei der Synthese auch entstehen müßte, kann es nicht sein, da bei der Spaltung des Körpers in seine optisch-aktiven Kom-

[9]) E. Fischer und O. Warburg, Spaltung des Leucins in die optisch-aktiven Komponenten mittels der Formylverbindung. Berichte d. deutsch. chem. Gesellsch. **38**, 3997 (1905).

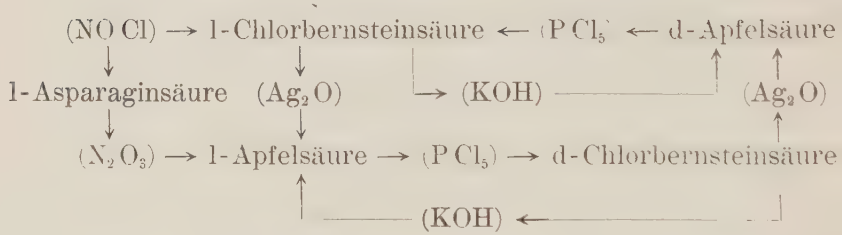
[10]) R. Locquin, Dédoublement de l'acide α-amino-β-méthyl-β-éthylpropionique en ses deux inverses optiques. I. Bull. soc. chim. (4) **1**, 595 (1907).

ponenten die spezifischen Drehungsvermögen der einzelnen Fraktionen mit denen des leichter löslichen Isoleucins fast übereinstimmten.

Ich habe nun zunächst das Verhalten des Isoleucins bei der sogenannten Waldenschen Umkehrung untersucht, d. h. ob es sich überhaupt umkehren läßt und im Falle der Umkehrung in welcher Weise.

Man versteht unter der Waldenschen Umkehrung bei optisch-aktiven Substanzen den Übergang einer optischen Antipode in ein Derivat der anderen.

P. Walden[11]) machte seine Untersuchungen bei der l-Asparaginsäure und der d-Apfelsäure. Man kann die von ihm erzielten Resultate in folgender Übersicht angeben:



Emil Fischer[12]) dehnte nun diese Untersuchungen P. Waldens, die er „seit den grundlegenden Unter-

[11]) P. Walden, Über die gegenseitige Umwandlung optischer Antipoden. Berichte d. deutsch. chem. Gesellsch. **29**, 133 (1896); **30**, 2795 u. 3146 (1897); **32**, 1833 u. 1855 (1899).

[12]) Emil Fischer, Zur Kenntnis der Waldenschen Umkehrung. Berichte **40**, 489 (1907). — Emil Fischer und Helmuth Scheibler, Zur Kenntnis der Waldenschen Umkehrung II. Berichte **41**, 889 (1908). — Emil Fischer und Helmuth Scheibler, Zur Kenntnis der Waldenschen Umkehrung III. Berichte **41**, 2891 (1908). — Emil Fischer und Helmuth Scheibler, Zur Kenntnis der Waldenschen Umkehrung IV. Berichte **42**, 1219 (1909). — Emil Fischer, Helmuth Scheibler und Reinhart Groh, Zur Kenntnis der Waldenschen Umkehrung V. Berichte **43**, 2020 (1910).

suchungen Pasteurs die überraschendste Beobachtung auf dem Gebiete der optisch-aktiven Substanzen" nannte[13]), auf die Aminosäuren aus. Die Einwirkung von Nitrosylbromid auf optisch-aktive Aminosäuren zeigte nun verschiedenartige Resultate, die für Alanin, Leucin und Valin in schematischer Form hier wiedergegeben werden sollen:

A. Alanin.

l-Alanin
↓ (NO Br)
d-Brompropionsäure
↓ (NH_3)
d-Alanin

B. Leucin.

d-Leucin
↓ (NO Br)
d-Bromisocapronsäure
↓ (NH_3)
l-Leucin

C. Valin.

l-Valin
↓ (NO Br)
d-Bromisovaleriansäure
↓ (NH_3)
l-Valin

Es galt nun zuerst, zu untersuchen, wie sich Isoleucin der Einwirkung von Nitrosylbromid gegen-

[13]) Emil Fischer, Zur Kenntnis der Waldenschen Umkehrung. Berichte **40**, 489 (1907).

über verhält, ob es sich analog dem Alanin, Leucin oder Valin verhält.

Ich habe gefunden, daß es sich wie Valin verhält. Aus l-Isoleucin erhielt ich wohl die rechtsdrehende Bromfettsäure, doch beim Amidieren derselben wieder l-Isoleucin.

Chlorierte ich jedoch die Bromfettsäure mit Thionylchlorid, so erhielt ich ein ebenfalls rechtsdrehendes Chlorid derselben. Dieses mit Glykokoll gekuppelt, lieferte einen rechtsdrehenden Bromkörper des Dipeptides, und dieser ergab amidiert das Dipeptid selbst.

Unterwarf ich das Dipeptid der Hydrolyse, so konnte ich rechtsdrehendes Isoleucin isolieren. Das Isoleucin verhält sich auch hier dem Valin ganz analog. Man kann also auch die in der Natur nicht vorkommende optische Komponente, das l-Isoleucin, sehr wohl zur Synthese von d-Isoleucin enthaltenden Polypeptiden benutzen.

Die erhaltenen Resultate seien in folgender Übersicht wiederholt:

l-Isoleucin
(Formyl-l-isoleucin)
↓ (NO Br)
d-α-Brom-β-methyl-β-äthylpropionsäure → (NH$_3$) → l-Isoleucin
↓ ($SOCl_2$)
d-α-Brom-β-methyl-β-äthylpropionylchlorid
↓ (Glykokoll)
d-α-Brom-β-methyl-β-äthylpropionylglycin
↓ (NH_3)
d-Isoleucylglycin
↓ (Hydrolyse) ↓
d-Isoleucin Glykokoll

Es wurden ferner Versuche gemacht, dl-Isoleucin, d. h. inaktives Isoleucin, enthaltende Polypeptide darzustellen, um das Verhalten des Isoleucins bei der Kupplung mit anderen Aminosäuren kennen zu lernen.

Ich stellte hier das Glycyl-dl-isoleucin dar; die Kupplung des Isoleucins mit Chloracetylchlorid und die Amidierung des Chloracetyl-dl-isoleucins verliefen völlig normal, so daß bei der Ausdehnung der Versuche auf optisch-aktive Polypeptide hier keine Schwierigkeiten zu erwarten waren.

Von optisch-aktiven Polypeptiden habe ich außer dem bereits erwähnten d-Isoleucylglycin das l-Leucyl-d-isoleucin, dessen Anhydrid, das d-Alanyl-l-leucyl-d-isoleucin und das Glycyl-d-alanyl-l-leucyl-d-isoleucin dargestellt. Von dem Tri- und Tetrapeptid stellte ich auch die Kupfersalze her.

Das l-Leucyl-d-isoleucin wurde durch Kupplung von d-Isoleucin mit d-α-Bromisocapronylchlorid dargestellt. Die Reaktion verlief sehr glatt, und auch das entsprechende Dipeptid kristallisierte sehr gut aus.

Das l-Leucyl-d-isoleucinanhydrid habe ich über den Methylester des Dipeptides gewonnen; von einer Isolierung des Esterchlorhydrates wurde abgesehen.

Das Dipeptid mit d-Brompropionylchlorid gekuppelt lieferte in guter Ausbeute den Bromkörper des Tripeptides. Amidiert ergab es das Tripeptid selbst.

Sein Kupfersalz ist violett gefärbt. Aus dem Tripeptid stellte ich über das Chloracetyl-d-alanyl-l-leucyl-d-isoleucin das Tetrapeptid Glycyl-d-alanyl-l-leucyl-d-isoleucin dar. Auch dieses wurde sehr gut kristallisiert und in guter Ausbeute erhalten.

Das Dipeptid l-Leucyl-d-isoleucin gibt keine Biuretreaktion; das Tripeptid gibt schwache, das Tetrapeptid sehr deutliche Biuretreaktion.

Der Geschmack des Dipeptides ist deutlich bitter. Da das Tri- und das Tetrapeptid eine sehr geringe Löslichkeit in Wasser haben, so ist bei ihnen der Geschmack zuerst nicht deutlich; sie haben jedoch auch einen bestimmt bitteren Nachgeschmack.

Durch ihre geringe Löslichkeit in Wasser sowie durch das fast gleich große Drehungsvermögen ihrer Spaltungsprodukte läßt sich auch bei dem Tri- und Tetrapeptid die Spaltung durch Hefepreßsaft schlecht verfolgen. Verfahren wurde nach der üblichen Methode. Die Resultate der Spaltung lassen sich wie folgt angeben:

1. l-Leucyl-d-isoleucin:

$$\overbrace{\underbrace{\text{l-Leucyl-}}_{-10{,}34^\circ}\underbrace{\text{d-isoleucin}}_{+9{,}74^\circ}}^{+18{,}13^\circ}$$

2. d-Alanyl-l-leucyl-d-isoleucin:

$$\overbrace{\underbrace{\text{d-Alanyl-}}_{+2{,}7^\circ}\overbrace{\underbrace{\text{l-leucyl-}}_{-10{,}34^\circ}\underbrace{\text{d-isoleucin}}_{+9{,}74^\circ}}^{+18{,}13^\circ}}^{-9{,}12^\circ}$$

Zum Schluß seien die Schmelzpunkte (korrigiert) und die spezifischen Drehungen der dargestellten Verbindungen in der nebenstehenden Tabelle angegeben.

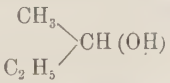
	F.-P.	$(\alpha)_D^{20}$ in					
		Wasser	$^1/_1$ n.-HCl	$^1/_1$ n.-Na OH	Alkohol	Eisessig	Essigäther
d-α-Brom-β-methyl-β-äthylpropionyl-glycin	91/92°	—	—	—	+ 64,42°	—	—
d-Isoleucylglycin	162°	+ 33,59°	—	—	—	—	—
d-α-Bromisocapronyl-d-isoleucin . .	157 158°	—	—	—	—	—	+ 48,97°
l-Leucyl-d-isoleucin	288°	+ 18,13°	+ 20,17°	— 0,....°	—	—	—
d-α-Brompropionyl-l-leucyl-d-isoleucin	164°	—	—	—	— 23,37°	—	—
d-Alanyl-l-leucyl-d-isoleucin . . .	245°	— 9,12°	— 24,89°	— 45,72°	—	—	—
Chloracetyl-d-alanyl-l-leucyl-d-isoleucin	197°	—	—	—	— 54,83°	—	—
Glycyl-d-alanyl-l-leucyl-d-isoleucin .	251°	—	— 80,59°	— 78,44°	—	—	—
l-Leucyl-d-isoleucinanhydrid	291°	—	—	—	—	— 35,76°	—
Chloracetyl-dl-isoleucin	105/106°	—	—	—	—	—	—
Glycyl-dl-isoleucin	242°	—	—	—	—	—	—

B. Experimenteller Teil.

I. Darstellung des dl-Isoleucins.

Das zu meinen Untersuchungen nötige Isoleucin habe ich, wie bereits im theoretischen Teil angeführt, im Prinzip nach der von Felix Ehrlich sowie von Friedmann und Brasch angegebenen Methode dargestellt. Es sollen hier nur die besonderen Modifikationen der Methode genauer angegeben werden.

1. Sekundärer Butylalkohol.

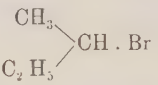


Als Ausgangsmaterial diente käufliches, technisch reines Methyläthylketon. Es wurde nach der Methode von Norris und Green[14]) mit metallischem Natrium zu sekundärem Butylalkohol reduziert. Wiederholte Versuche ergaben, daß das Eintragen des Natriums in viel kürzerer Zeit erfolgen kann, als es von Norris und Green angegeben worden ist. Ich brauchte zur Reduktion von viermal je 72 g Methyläthylketon mit zusammen 550 g Natrium nur 5 Stunden an Stelle der vorgeschriebenen 4 Tage. Sehr wesentlich ist eine sorgfältige Eiskühlung. Es ist dann auch die

[14]) J. F. Norris and E. H. Green, Some new derivatives of secondary butylalcohol. Amer. chem. Journ. **26**, 293 (1901).

Menge des als Nebenprodukt entstehenden Pinakons gering. Die Ausbeute an sekundärem Butylalkohol betrug im Durchschnitt 75 Proz.

2. Sekundäres Butylbromid.



Zur Bromierung des sekundären Butylalkohols wandte ich eine nach den Angaben von Freundler und Damond[15]) sowie von Norris und Green[16]) (Johnson) kombinierte Methode an.

Ich kühlte 100 g sekundären Alkohol gut in Eis und ließ durch einen in das aufgesetzte Kühlerrohr eingeführten Tropftrichter 200 g Phosphortribromid langsam zulaufen. Der Zufluß wurde so reguliert, daß kaum Bromwasserstoff entwich. Das Reaktionsprodukt erhitzte ich nach $^1/_4$ stündigem Stehen so lange auf dem Wasserbade, als noch Bromwasserstoff entwich. Die Dauer dieser Operation war im Durchschnitt eine Stunde. Alsdann goß ich das Reaktionsprodukt in Eiswasser, trennte die Bromidschicht im Scheidetrichter ab und ätherte die zurückbleibende Lösung wiederholt aus. Die Ätherauszüge gab ich zur Bromidschicht. Zur Entfernung des Phosphorwasserstoffs und der phosphorigen Säure schüttelte ich die Ätherauszüge mit einer 10proz. Natriumcarbonatlösung, trennte im Scheidetrichter und trocknete die ätherische Lösung gründlich mit Natriumsulfat. Den Äther destillierte ich ab und reinigte das sekundäre Butylbromid durch fraktionierte Destillation.

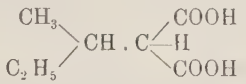
[15]) P. Freundler et E. Damond, Sur le préparation de l'alcool amylique racémique. Compt. rend. **141**, 830 (1905).

[16]) Vide Anmerkung 14.

Zur Verbesserung der Ausbeuten ist es ratsam, den abdestillierten Äther sowie die Vorläufe einer nochmaligen fraktionierten Destillation zu unterwerfen, da das Bromid mit den Ätherdämpfen sehr leicht flüchtig ist. In gleicher Weise verfuhr ich auch bei der Darstellung des sekundären Butylalkohols.

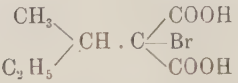
Die Ausbeute an sekundärem Butylbromid betrug im Durchschnitt 75 Proz. des angewandten Butylalkohols.

3. Sekundäre Butylmalonsäure.



Die Gewinnung dieser Säure erfolgte in der üblichen Weise (Emil Fischer) durch Kupplung von sekundärem Butylbromid mit Natriummalonester. Die entstehende Butylmalonsäure bot insofern Schwierigkeiten, als sie nur sehr schwer in die feste Form überging. Diese sowohl von Ehrlich als auch von Friedmann und Brasch angegebenen Schwierigkeiten überwand ich am besten, wenn ich die im Laufe der Operationen resultierende ätherische Lösung der sekundären Butylmalonsäure zunächst bei gewöhnlichem Druck verdampfte, dann die letzten Spuren des Äthers unter vermindertem Druck vertrieb und nunmehr so lange auf 50° erhitzte, bis die anfänglich sirupförmige Säure zu einer festen Masse erstarrte. Durch diese Maßnahme erhielt ich immer feste sekundäre Butylmalonsäure. Die Durchschnittsausbeute betrug 80 Proz.

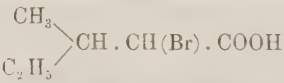
4. Sekundäre Butylbrommalonsäure.



Beim Bromieren der so erhaltenen sekundären Butylmalonsäure ergab sich, daß eine Reinigung der rohen Säure durch Umkristallisieren nicht nötig ist. Die Bromierung nahm ich in ätherischer Lösung mit Brom vor. Die Reaktion verlief glatt; Eiskühlung hemmte den sonst stürmischen Verlauf der Bromierung. Auch hier erhitzte ich stets die ätherische Lösung der sekundären Butylbrommalonsäure unter vermindertem Druck, wie oben angegeben, um die Säure in fester Form zu erhalten. Zur Reinigung wurde die Säure stets aus Benzol umkristallisiert, da es für die weiteren Operationen vorteilhafter war, mit ganz reiner sekundärer Butylbrommalonsäure zu arbeiten.

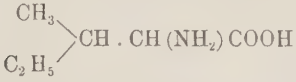
Die Ausbeute an reiner sekundärer Butylbrommalonsäure betrug 80 Proz.

5. α-Brom-β-methyl-β-äthylpropionsäure.



Die Abspaltung des Carboxyls wurde nach der von Emil Fischer gegebenen Vorschrift vorgenommen. Die Ausbeute war fast quantitativ. Die Säure wurde als farbloses Öl erhalten. Da bei den Versuchen über die Waldensche Umkehrung des Isoleucins die rechtsdrehende Komponente dieser Säure von mir in kristallisierter Form erhalten wurde, so stellte ich auch Versuche an, die inaktive Säure kristallisiert zu erhalten. Diese Versuche schlugen jedoch fehl.

6. α-Amino-β-methyl-β-äthylpropionsäure (dl-Isoleucin).



Auch die Amidierung der Bromfettsäure nahm ich nach Emil Fischers Vorschrift vor. Gewöhnlich wurde die Säure mit der 10- bis 15fachen Menge 25 proz. Ammoniaks 6 Tage im Brutschrank bei 37,5° stehen gelassen.

Im allgemeinen Teil habe ich bereits die einige Male hier aufgetretenen Ausnahmefälle erwähnt, so daß hier nicht darauf eingegangen zu werden braucht.

Das dl-Isoleucin wurde stets aus Wasser umkristallisiert. Da die Trennung des Isoleucins von dem Bromammonium sich nicht ganz quantitativ durchführen ließ, so wurden die isoleucinhaltigen Bromammoniumrückstände der sämtlichen Amidierungsversuche gesammelt. Das Isoleucin wurde nach der üblichen Methode verestert, die in Freiheit gesetzten Ester ausgeäthert und schließlich verseift. So gelang es, wenigstens einen größeren Teil des Isoleucins aus den Rückständen noch darzustellen.

II. Spaltung des dl-Isoleucins in seine optisch-aktiven Komponenten.

1. Formylierung des dl-Isoleucins.

Die Formylierung nahm ich nach E. Fischer und O. Warburgs Vorschrift vor. Bereits Locquin hatte die Anwendungsmöglichkeit dieser Methode auf Isoleucin festgestellt.

Hier hat es sich durch wiederholte Versuche als zweckmäßig erwiesen, das Roh-Formyl-dl-isoleucin

vor dem zur Trennung von dem nicht formylierten Isoleucin nötigen Zerreiben mit Normal-Salzsäure im Vakuumexsikkator über Kalk und Kaliumhydroxyd mehrere Tage, bis zum Verschwinden des Geruches nach Ameisensäure, scharf zu trocknen.

Es war dann die Ausbeute an zum Umkristallisieren reifem Formyl-dl-isoleucin viel besser. Das Formyl-dl-isoleucin wurde vor der Brucinspaltung stets umkristallisiert.

2. Spaltung des Formyl-dl-isoleucins mit Hilfe der Brucinsalze.

Die Spaltung verlief vollkommen normal. Das Brucinsalz des Formyl-l-isoleucins kristallisiert beim Stehen der alkoholischen Lösung in 24 Stunden quantitativ aus.

Die Abspaltung des Brucins wurde in der üblichen Weise mit Normal-Natronlauge vorgenommen.

Die Formylverbindungen des d- und des l-Isoleucins wurden aus der 10fachen Menge Wasser umkristallisiert.

Zur Bestimmung der spezifischen Drehung wurde in absolutem Alkohol gelöst, und wurden folgende Werte erhalten:

Formyl-d-isoleucin $(\alpha)_D^{20} = +27{,}39^0$,

Formyl-l-isoleucin $(\alpha)_D^{20} = -24{,}28^0$.

3. Abspaltung der Formylgruppe bei dem Formyl-d-isoleucin.

In der üblichen Weise wurde das Formyl-d-isoleucin mit der 10fachen Menge 10proz. Salzsäure verseift. Die Weiterverarbeitung geschah ebenfalls

nach der von E. Fischer und O. Warburg angegebenen Methode.

Ich fand für d-Isoleucin

$(\alpha)_D^{20} = +22{,}43^0$ in Normal-Salzsäure,

$(\alpha)_D^{20} = +41{,}29^0$ in 20 proz. Salzsäure.

Zu den Versuchen über die Waldensche Umkehrung wurde die Verseifung mit 20 proz. Bromwasserstoffsäure vorgenommen. Die Versuche wurden mit Formyl-l-isoleucin ausgeführt. Das l-Isoleucin wurde nicht isoliert. Näheres siehe weiter unten.

III. Versuche über die Waldensche Umkehrung bei Isoleucin.

1. Verwandlung des l-Isoleucins in d-α-Brom-β-methyl-β-äthylpropionsäure.

5 g Formyl-l-isoleucin $[(\alpha)_D^{20} = -24{,}28^0]$ wurden eine Stunde mit 23 ccm 20 proz. Bromwasserstoffsäure am Rückflußkühler gekocht. Darauf wurde die Flüssigkeit unter vermindertem Druck vollständig zur Trockne verdampft. Das erhaltene bromwasserstoffsaure l-Isoleucin wurde in 12½ ccm 20 proz. Bromwasserstoffsäure gelöst, in einer Kältemischung von Eis und Salz stark abgekühlt und dann in fünf Portionen 7,5 g Brom unter gleichzeitigem Einleiten eines kräftigen Stromes von Stickoxyd zugegeben. Das Einleiten von Stickoxyd wurde 2½ Stunden fortgesetzt und nach Zugabe von weiteren 3 g Brom noch 1½ Stunden fortgeführt.

Zur Entfernung des überschüssigen Broms wurde ¼ Stunde ein kräftiger Luftstrom durch die Flüssigkeit gesaugt und hierauf der Rest des Broms mit

schwefliger Säure entfernt. Die ölig abgeschiedene Bromfettsäure wurde dreimal mit je 50 ccm Äther ausgeäthert und der Ätherauszug mit Natriumsulfat unter häufigem Umschütteln getrocknet. Die Bromfettsäure wurde im Vakuum bei 2 mm Druck abdestilliert. Sie ging bei 102° als farblose Flüssigkeit über und erstarrte in der mit Eis und Salz gekühlten Vorlage zu weißen Kristallen.

Die Rohausbeute an Bromfettsäure betrug 2,25 g. Die erhaltene Bromfettsäure wurde aus 1 ccm Petroläther umkristallisiert. Beim Abkühlen in einer Kältemischung trat sofort Kristallisation ein. Die Kristalle wurden auf einem eisgekühlten Trichter abgesaugt und mit 1 ccm eiskalten Petroläthers gewaschen.

Die Mutterlauge wurde aufgearbeitet.

Die erhaltene Bromfettsäure wird bei 30° weich und ist bei 39° klar geschmolzen.

Zur optischen Bestimmung wurde in thiophenfreiem Benzol gelöst:

0,4016 g Substanz. Gesamtgewicht der Lösung 4,0130 g. $d^{20} = 0{,}9170$. Drehung im 1 dcm-Rohr bei 20° und Natriumlicht 2,43° nach rechts. Mithin:

$$(\alpha)_D^{20} = +26{,}48^\circ \ (\pm 0{,}2^\circ).$$

Die Brombestimmung nach Carius ergab:
0,1909 g Substanz gaben 0,1826 g Ag Br.

$C_6H_{11}O_2Br$:

Ber. Br 41,03 Proz. Gef. Br 40,71 Proz.

Bei Wiederholungen dieser Versuche wurde später bei Anwendung von 10 g Formyl-l-isoleucin eine Durchschnittsausbeute von 9,7 g Bromfettsäure erhalten.

2. Überführung der d-α-Brom-β-methyl-β-äthyl-propionsäure in l-Isoleucin.

1,5 g d-Bromfettsäure wurden in 15 ccm 25proz. Ammoniaks gelöst und 3 Tage bei 37° stehen gelassen. Beim Eindampfen der Lösung erfolgte Kristallisation (0,5 g). Das bromfreie Produkt wurde zur optischen Bestimmung in Wasser gelöst.

0,1102 g Substanz. Gesamtgewicht der Lösung 3,9146 g. $d^{20} = 1{,}0054$. Drehung im 1 dcm-Rohr bei 20° und Natriumlicht 0,31° nach links. Mithin:

$$(\alpha)_D^{20} = -11{,}39^\circ \ (\pm 0{,}6^\circ).$$

Locquin gibt für l-Isoleucin in wässeriger Lösung $(\alpha)_D^{20} = -10{,}55^\circ$ an.

Zur Analyse wurde über Phosphorpentoxyd im Vakuum bei 100° getrocknet.

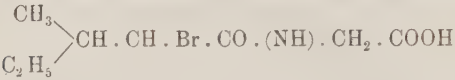
0,1291 g Substanz gaben 0,2600 g CO_2, 0,1167 g H_2O.

$C_6H_{13}NO_2$:	Ber.	C 54,96	H 9,92	Proz.
	Gef.	C 54,92	H 10,11	-

3. Darstellung von d-α-Brom-β-methyl-β-äthyl-propionylchlorid.

8,5 g d-α-Brom-β-methyl-β-äthylpropionsäure wurden 3 Stunden mit 20 g Thionylchlorid am Rückflußkühler auf 60° erhitzt. Nach Verjagen des überschüssigen Thionylchlorids wurde das Säurechlorid unter stark vermindertem Druck destilliert. Siedepunkt 67° bei 3 mm Druck. Ausbeute 7 g.

4. d-α-Brom-β-methyl-β-äthylpropionylglycin.



3,66 g Glykokoll, gelöst in 29,5 ccm Normal-Natronlauge, wurden mit 7 g d-α-Brom-β-methyl-β-äthylpropionylchlorid und 39 ccm Normal-Natronlauge gekuppelt. Zur Entfärbung wurde mit etwas Tierkohle geschüttelt und das Filtrat mit 8 ccm fünffach Normal-Salzsäure übersättigt.

Das Kupplungsprodukt fiel zuerst als Öl aus; beim Stehen im Eisschrank erstarrte die ganze Flüssigkeit zu einer kristallinischen Masse. Der Bromkörper wurde abgesaugt und die Mutterlauge nach beträchtlicher Konzentration ausgeäthert. Durch Ausfällen der getrockneten Ätherauszüge mit Petroläther ließen sich noch 0,5 g Bromkörper gewinnen. Die Gesamtausbeute betrug 8 g.

Der Bromkörper wurde, aus der 5fachen Menge heißen Wassers umkristallisiert, in kleinen, verflochtenen Nadeln erhalten. Der Bromkörper ist in Wasser löslich, in verdünntem Alkohol, absolutem Alkohol, Methylalkohol, Äther, Essigäther, Chloroform und Aceton sehr leicht löslich, in Benzol löslich, in Petroläther unlöslich.

Er beginnt bei 85° zu sintern und ist bei 91 bis 92° (korr.) klar geschmolzen. Zur Analyse wurde er bei 80° über Phosphorpentoxyd getrocknet.

0,2046 g Substanz gaben 0,1539 g Ag Br.

0,1063 g Substanz gaben 5,2 ccm N bei 23° und 762 mm Druck.

0,1560 g Substanz gaben 0,2171 g CO_2 und 0,0797 g H_2O.

$C_8H_{14}NO_3Br$:

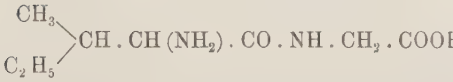
Ber.	Br 31,75	C 38,10	H 5,56	N 5,56 Proz.
Gef.	Br 32,01	C 37,95	H 5,71	N 5,56 -

Zur optischen Bestimmung wurden 0,1890 g Substanz in absolutem Alkohol gelöst.

Gesamtgewicht der Lösung 4,2550 g. $d^{20} = 0{,}8037$. Abgelesene Drehung im 1 dcm-Rohr bei 20° und Natriumlicht 2,30° nach rechts. Mithin:

$$(\alpha)_D^{20} = +64{,}42^0\ (\pm 0{,}2^0).$$

5. d-Isoleucylglycin.



6 g d-α-Brom-β-methyl-β-äthylpropionylglycin wurden mit 40 ccm 25proz. wässerigen Ammoniaks 5 Tage im Brutschrank aufbewahrt. Die Lösung wurde nach erfolgter Filtration unter vermindertem Druck eingedampft. Die Entfernung des Brom-ammoniums bereitete Schwierigkeit; es wurde Silber-sulfat angewandt. Die schließlich resultierende Lösung des Dipeptides wurde unter vermindertem Druck zur Trockne verdampft, der Rückstand in wenig Alkohol gelöst und das Dipeptid mit Äther gefällt. Die Menge des erhaltenen Rohproduktes betrug 2 g. Durch Um-kristallisieren aus Essigäther wurden 0,45 g reines Produkt erhalten. Schmelzpunkt 162° (korr.).

Es gelang nicht, aus der Mutterlauge weitere Mengen des reinen Dipeptides zu erlangen.

Das Dipeptid ist in Wasser, Alkohol, Methyl-alkohol, Aceton und Chloroform leicht löslich, in Essigäther und Benzol löslich, in Äther und Petrol-äther unlöslich.

Zur optischen Bestimmung wurden 0,3106 g in Wasser gelöst.

Gesamtgewicht 5,2650 g. $d^{20} = 1{,}020$. Abgelesene Drehung bei Natriumlicht und 20° 2,02° nach rechts. Mithin:

$$(\alpha)_D^{20} = +33{,}59^\circ \ (\pm 0{,}2^\circ).$$

6. Hydrolyse des d-Isoleucylglycins.

0,3 g d-Isoleucylglycin wurden mit 25 ccm 25proz. Schwefelsäure 8 Stunden am Rückflußkühler erhitzt. Nach Entfernung der Schwefelsäure mit Barythydrat dampfte ich die Lösung unter vermindertem Druck auf ein kleines Volumen ein. Die Lösung drehte 0,81° nach rechts. Der Versuch, die beiden entstandenen Aminosäuren — Glykokoll und Isoleucin — durch fraktionierte Kristallisation zu trennen, ergab kein befriedigendes Resultat. Ich schied das Glykokoll schließlich in Form seines Pikrates ab[19]). Ich löste den beim Eindampfen der Hydrolysenflüssigkeit verbleibenden Rückstand in 3 ccm Wasser und gab eine Lösung von 0,3 g Pikrinsäure in 1 ccm absolutem Alkohol hinzu. Das sich abscheidende Glykokollpikrat wurde abzentrifugiert. Es schmolz gegen 190°. Das Filtrat vom Glykokollpikrat wurde mit Salzsäure angesäuert und die Pikrinsäure ausgeäthert.

Die wässerige Lösung, die das salzsaure Salz des d-Isoleucins enthalten mußte, wurde zur Trockne verdampft und der Rückstand zur Bestimmung des Drehungsvermögens verwendet.

Das so gewonnene Präparat drehte etwa 10° nach rechts.

[19]) P. A. Levene, Glykokoll-Pikrate. The Journal of Biol. Chemistry, I, 413 (1906).

Da die ursprüngliche Lösung des d-Isoleucins ein viel höheres Drehungsvermögen gezeigt hatte, so bleibt nur die Annahme übrig, daß das isolierte Isoleucin durch die mannigfachen Operationen razemisiert worden ist. Immerhin darf es als festgestellt gelten, daß das Dipeptid d-Isoleucin enthielt.

IV. Polypeptide des dl-Isoleucins.

Glycyl-dl-Isoleucin.

a) Chloracetyl-dl-isoleucin.

$$CH_2 . Cl . CO . NH . CH . (COOH) . CH\begin{matrix}CH_3\\C_2H_5\end{matrix}$$

6 g dl-Isoleucin wurden in 45,9 ccm Normal-Natronlauge (1 Mol.) gelöst und abwechselnd 10 g Chloracetylchlorid (2 Mol.) und 162 ccm Normal-Natronlauge (3,5 Mol.) unter Eiskühlung gegeben. Zur Isolierung des Kupplungsproduktes wurde die filtrierte Reaktionsflüssigkeit mit 16 ccm 5fach normaler Salzsäure angesäuert. Nach kurzer Zeit erfolgte Kristallisation. Die Kristalle wurden abgesaugt. Die Mutterlauge engte ich unter vermindertem Druck auf etwa 50 ccm ein. Nun ätherte ich 4mal mit je 50 ccm Äther aus. Die ätherische Lösung wurde nach vorhergehender Trocknung mit Natriumsulfat unter vermindertem Druck auf etwa 30 ccm eingeengt. Das Chloracetyl-dl-isoleucin wurde nunmehr mit Petroläther ausgefällt. Die Ausbeute betrug 7,7 g (77 Proz.). Umkristallisiert wurde das Rohprodukt aus der 16fachen Menge heißen Wassers.

Das Chloracetyl-dl-isoleucin löst sich in heißem Wasser leicht, schwerer in kaltem. In absolutem Alkohol, in Methylalkohol und Äther ist es leicht

löslich, auch in Essigäther, Aceton, Chloroform und warmem Benzol ist es löslich.

Aus letzterem kristallisiert es beim Erkalten wieder aus. In Petroläther ist es unlöslich. Das Chloracetyl-dl-isoleucin beginnt beim Erhitzen im Kapillarröhrchen bei 100° zu sintern und ist bei 105 bis 106° (korr.) klar geschmolzen.

Zur Analyse wurde es bei 80° über Phosphorpentoxyd getrocknet.

0,1901 g Substanz gaben 0,3208 g CO_2 und 0,1170 g H_2O.

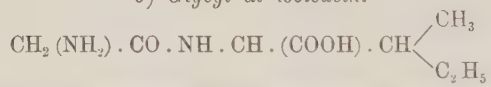
0,3210 g Substanz verbrauchten nach Kjeldahl 15,6 ccm $^1/_{10}$ n.-H_2SO_4.

0,2007 g Substanz gaben 0,1386 g AgCl.

$C_8H_{14}NO_3Cl$:

Ber.	C 46,24	H 6,79	N 6,76	Cl 17,07 Proz.
Gef.	C 46,02	H 6,88	N 6,80	Cl 17,07 -

b) Glycyl-dl-isoleucin.



4,85 g Chloracetyl-dl-isoleucin wurden unter schwachem Erwärmen in 50 ccm 25proz. wässerigen Ammoniak gelöst. Nach 3tägigem Stehen bei 37° wurde die Lösung unter vermindertem Druck zur Trockne verdampft. Zur Entfernung des Chlorammoniums wurde Silbersulfat angewandt.

Es gelang mir nicht, das Dipeptid in Kristallform zu erhalten. Es wurde in verdünntem Alkohol gelöst und mit Äther gefällt. Die Ausbeute betrug infolge von Verlusten nur 2,3 g.

Das Dipeptid ist in Wasser leicht löslich, in Alkohol schwer, in Aceton, Methylalkohol und Essigäther ebenfalls schwer löslich, in Äther unlöslich.

Das Dipeptid beginnt beim Erhitzen im Kapillarröhrchen bei 215° sich zu bräunen, sintert bei 219° und schmilzt gegen 242° (korr.). Zur Analyse wurde es bei 100° über Phosphorpentoxyd getrocknet.

0,1374 g Substanz gaben 0,2535 g CO_2 und 0,1071 g H_2O.

0,1555 g Substanz verbrauchten nach Kjeldahl 16,85 ccm $^1/_{10}$ n.-H_2SO_4.

	$C_8H_{16}N_2O_3$:		
Ber.	C 50,86	H 8,35	N 14,92 Proz.
Gef.	C 50,32	H 8,71	N 15,17 -

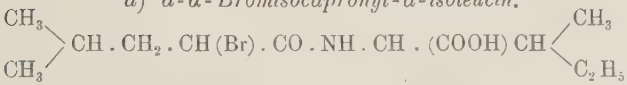
V. Optisch-aktive Polypeptide des d-Isoleucins.

1. d-Isoleucylglycin.

Siehe IV., 4. und 5.

2. l-Leucyl-d-isoleucin.

a) d-α-Bromisocapronyl-d-isoleucin.



4 g d-Isoleucin (1 Mol.) wurden in 30,8 ccm Normal-Natronlauge (1 Mol.) gelöst. Dazu wurden in 6 Portionen abwechselnd 6,6 g d-α-Bromisocapronylchlorid (etwas mehr als 1 Mol.) und 46 ccm Normal-Natronlauge unter Eiskühlung zugegeben. Beim Ansäuern mit 9,6 ccm 5fach Normal-Salzsäure fiel der Bromkörper fast quantitativ aus. Aus der Mutterlauge konnte durch Ausäthern und Fällen mit Petroläther nur noch 0,1 g Bromkörper gewonnen werden. Die Ausbeute betrug 6,6 g (71 Proz.). Aus 50 ccm absolutem Alkohol, unter Zusatz von 75 ccm Wasser, wurde das d-α-Bromisocapronyl-d-isoleucin in derben, rhombischen Kristallen erhalten.

Der Bromkörper ist in kaltem Wasser wenig löslich, in heißem Wasser ziemlich leicht löslich. Sehr leicht löslich ist er in absolutem Alkohol, Methylalkohol, Essigäther, Äther, Aceton und Benzol. In Chloroform ist er leicht löslich, in Petroläther unlöslich.

Das d-α-Bromisocapronyl-d-isoleucin sintert bei 152° und ist bei 157—158° (korr.) klar geschmolzen.

Zur Analyse wurde es über Phosphorpentoxyd bei 80° getrocknet.

0,1789 g Substanz gaben 0,1085 g AgBr.

0,1886 g Substanz gaben 0,3193 g CO_2 und 0,1215 g H_2O.

0,0726 g Substanz gaben 2,8 ccm N bei 22,6° und 763 mm Druck.

$C_{12}H_{22}O_3NBr$:

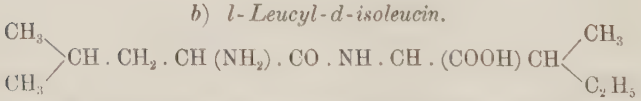
Ber.	Br 25,85	C 46,75	H 7,14	N 4,55	Proz.
Gef.	Br 25,81	C 46,16	H 7,20	N 4,42	-

Zur optischen Bestimmung wurde der Bromkörper in Essigäther gelöst.

0,1985 g Substanz. Gesamtgewicht der Lösung 4,2962 g. $d^{20} = 0{,}9051$. Drehung im 1 dcm-Rohr bei 20° und Natriumlicht 2,02° nach rechts. Mithin:

$$(\alpha)_D^{20} = +48{,}97^\circ \ (\pm 0{,}2^\circ).$$

b) l-Leucyl-d-isoleucin.



5 g d-α-Bromisocapronyl-d-isoleucin wurden mit 50 ccm 25proz. wässerigen Ammoniak 6 Tage bei 37,5° aufbewahrt. Die Lösung wurde alsdann unter vermindertem Druck vollständig zur Trockne verdampft und der Rückstand in heißem 96proz. Alkohol gelöst. Die alkoholische Lösung wurde im

Vakuum bis zur eintretenden Kristallisation eingeengt. Die abgesaugten Kristalle waren bromfrei. Dieser Prozeß wurde noch zweimal wiederhoit. Es gelang auf diese Weise 1,7 g vollständig bromfreies Dipeptid zu erhalten.

Die Mutterlauge, enthaltend Dipeptid und Bromammonium, wurde auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft. Hierbei ging ein Teil des Dipeptides in das Anhydrid über, das sich durch Unlöslichkeit in Wasser auszeichnete. Zur Entfernung des Bromammoniums wurde Silbersulfat angewandt.

Es gelang auf diese Weise, noch 0,9 g Dipeptid zu gewinnen. Ausbeute 2,4 g (62 Proz.). Aus 96proz. Alkohol, unter Zusatz von etwas Wasser, wurde es in würfelförmigen Kristallen erhalten.

Das Dipeptid ist in Wasser sehr leicht löslich, in absolutem Alkohol, Methylalkohol, Chloroform, Aceton und Benzol löslich, in Äther und Petroläther unlöslich. Es schmilzt beim Erhitzen im Kapillarrohr bei 288° (korr.). Es gibt keine Biuretreaktion.

0,2692 g Substanz, lufttrocken, verloren beim Erhitzen über Phosphorpentoxyd auf 80° 0,0280 g Kristallwasser.

Kristallwassergehalt für $1^1/_2$ Mol.:

Ber. H_2O 9,92 Proz. Gef. H_2O 10,40 Proz.

0,1550 g kristallwasserfreie Substanz gaben 0,3331 g CO_2 und 0,1386 g H_2O.

0,0632 g Substanz gaben 6,5 ccm N bei 22° und 763 mm Druck.

$C_{12}H_{24}O_3N_2$:

Ber.	C 59,02	H 9,84	N 11,47 Proz.
Gef.	C 58,61	H 10,03	N 11,76 -

Zur optischen Bestimmung wurde es in Normal-Salzsäure und Normal-Natronlauge gelöst.

In Normal-Salzsäure: 0,1182 g Substanz, entsprechend 0,1065 g wasserfreier Substanz. Gesamtgewicht 3,9852 g. $d^{20} = 1{,}020$. Abgelesene Drehung im 1 dcm-Rohr bei 20° und filtriertem Gasglühlicht 0,7° nach rechts. Mithin:

$$(\alpha)_D^{20} = +25{,}68^\circ \ (\pm 0{,}2^\circ).$$

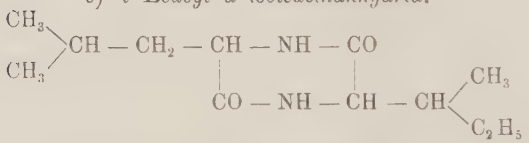
Die Natronlauge dreht das Dipeptid schwach nach links.

Es wurde die spezifische Drehung in wässeriger Lösung untersucht.

0,1338 g Substanz gelöst zu 7.6282 g Gesamtgewicht. $d^{20} = 1{,}0045$. Abgelesene Drehung im 1 dcm-Rohr bei 20° und filtriertem Gasglühlicht 0,32° nach rechts. Mithin:

$$(\alpha)_D^{20} = +18{,}13^\circ \ \pm 0{,}2^\circ).$$

c) l-Leucyl-d-isoleucinanhydrid.



1 g l-Leucyl-d-isoleucin wurde in 20 ccm Methylalkohol gelöst und durch Einleiten von trockenem, gasförmigem Chlorwasserstoffgas verestert. Die Lösung des Dipeptidesterchlorhydrates wurde einige Zeit im Eisschrank stehen gelassen, ohne daß sich Kristalle abschieden. Von einer Isolierung des l-Leucyl-d-isoleucinmethylesterchlorhydrates wurde abgesehen.

Zur Entfernung der freien Salzsäure wurde die Lösung mehrmals mit Methylalkohol unter vermindertem Druck verdampft. Es blieb eine sirupförmige Masse zurück.

Diese wurde in etwa 20 ccm Methylalkohol gelöst und trockenes Ammoniakgas in die Lösung bis zur Sättigung eingeleitet. Die Reaktionsflüssigkeit wurde verschlossen im Brutschrank bei 37,5° einige Zeit aufbewahrt.

Es schieden sich Kristalle des Anhydrides aus, die abgesaugt wurden. Die Mutterlauge wurde auf dem Wasserbade bis zur weiteren Kristallabscheidung eingeengt, die Kristalle abgesaugt. Dieser Prozeß wurde mehrere Male wiederholt.

Es gelang mir auf diese Weise, 0,73 g Anhydrid zu erhalten. Das Anhydrid ist in Alkohol und Eisessig leicht löslich, in Wasser schwer löslich, sehr schwer löslich in Essigäther. Es wurde aus der etwa 350fachen Menge Essigäther umkristallisiert und in sehr feinen und verflochtenen Nädelchen erhalten.

Die Kristalle zeigen den Schmelzpunkt 291° (korr.), nachdem sie bei 250° sinterten und bei 279° zu schmelzen begannen.

Zur Analyse wurde über Phosphorpentoxyd bei 100° getrocknet.

0,1203 g Substanz gaben 0,2820 g CO_2 und 0,1055 g H_2O.

$C_{12}H_{22}O_2N_2$:	Ber.	C	63,66	H	9,80 Proz.
	Gef.	C	63,93	H	9,81 -

Zur optischen Bestimmung wurde in Eisessig gelöst.

0,0934 g Substanz gelöst zu 7,3510 g Gesamtgewicht. $d^{20} = 1{,}0125$. Abgelesene Drehung im 1 dcm-Rohr bei 20° und filtriertem Gasglühlicht 0,46° nach links. Mithin:

$$(\alpha)_D^{20} = -35{,}76° \ (\pm 0{,}2°).$$

3. d-Alanyl-l-leucyl-d-isoleucin.

a) d-α-Brompropionyl-l-leucyl-d-isoleucin.

$CH_3 . CH(Br) . CO . NH . CH . CH_2 . CH . (CH_3)_2$

$. CO . NH . CH . (COOH)\ CH\begin{matrix}CH_3\\C_2H_5\end{matrix}$

6,8 g l-Leucyl-d-isoleucin (1 Mol.) wurden in 27 ccm Normal-Natronlauge (1 Mol.) gelöst und mit 6 g d-α-Brompropionylchlorid (1,2 Mol.) und 35 ccm Normal-Natronlauge in der üblichen Weise gekuppelt. Nach Ansäuern mit 10 ccm 5fach Normal-Salzsäure fiel der Bromkörper fast quantitativ kristallinisch aus. Gewicht des abgesaugten Bromkörpers 9,1 g (65 Proz.). Die Ausbeute konnte durch Ausäthern der Mutterlauge und Fällen der Ätherauszüge mit Petroläther nicht verbessert werden.

Der Bromkörper ist in Alkohol, absolutem sowie verdünntem, Methylalkohol, Essigäther und Äther sehr leicht löslich. In Wasser ist er ziemlich schwer löslich. In Chloroform ist er leicht, in Benzol löslich, in Petroläther unlöslich.

1,5 g Bromkörper wurden aus 30 ccm 50proz. Alkohol umkristallisiert.

Der Körper sintert bei 153° und ist bei 164° (korr.) klar geschmolzen. Zur Analyse wurde er über Phosphorpentoxyd bei 80° getrocknet.

0,1544 g Substanz gaben 0,2643 g CO_2 und 0,0989 g H_2O.

$C_{15}H_{27}O_4N_2Br$:	Ber.	C 47,61	H 6,92 Proz.
	Gef.	C 47,21	H 7,12 -

Zur optischen Bestimmung wurde in absolutem Alkohol gelöst.

0,1312 g Substanz zu 5,6948 g Gesamtgewicht. $d^{20} = 0{,}7985$. Abgelesene Drehung bei 20° und

filtriertem Gasglühlicht im 1 dcm-Rohr 0,43° nach links. Mithin:

$$(\alpha)_D^{20} = -23{,}37^\circ \ (\pm 0{,}2^\circ).$$

b) d-Alanyl-l-leucyl-d-isoleucin.

$CH_3 . CH(NH_2) CO . NH . CH . CH_2 . CH . (CH_3)_2$
$. CO . NH . CH . (COOH) . CH\langle^{CH_3}_{C_2H_5}$

7,5 g d-α-Brompropionyl-l-leucyl-d-isoleucin wurden in 100 ccm 25 proz. wässerigen Ammoniak gelöst und 7 Tage bei 37,5° im Brutschrank stehen gelassen. Die Reaktionsflüssigkeit wurde alsdann unter vermindertem Druck bis zur Kristallabscheidung eingedampft. Die Kristalle wurden abgesaugt und die Mutterlauge drei weitere Male bis zur Abscheidung von Kristallen eingeengt. Es gelang mir auf diese Weise 3,6 g vollständig bromammoniumfreies Tripeptid zu erhalten.

Die schließlich resultierende Mutterlauge wurde im Vakuum vollständig zur Trockne eingedampft, in Wasser aufgenommen und das Bromammonium mit Silbersulfat entfernt.

Ich erhielt noch 0,4 g Tripeptid. Gesamtausbeute mithin 4 g. Das Tripeptid ist in Wasser ziemlich schwer löslich, in Alkohol schwer, in Benzol, Chloroform und Essigäther sehr schwer, in Methylalkohol schwer, in Petroläther und Äther unlöslich.

1,5 g Tripeptid wurden aus absolutem Alkohol, dem 10 ccm 25 proz. Ammoniak zugesetzt waren, umkristallisiert. Beim Wegkochen des Ammoniaks schied sich das Tripeptid in kleinen Nädelchen ab. Das Tripeptid gibt schwache Biuretreaktion.

Beim Erhitzen im Kapillarrohr schmilzt das Tripeptid bei 245° (korr.) unter Zersetzung und Bräunen,

nachdem es bei 231° sinterte. Zur Analyse wurde es bei 80° über Phosphorpentoxyd getrocknet.

0,1283 g Substanz gaben 0,2649 g CO_2 und 0,1021 g H_2O.

0,1731 g Substanz gaben 20,1 ccm N bei 20° und 756 mm Druck.

$C_{15}H_{29}O_4N_3$:

Ber.	C 57,20	H 8,91	N 13,40	Proz.
Gef.	C 56,31	H 8,90	N 13,32	-

Zur optischen Bestimmung wurde in Normal-Salzsäure und Normal-Natronlauge gelöst.

In Normal-Salzsäure: 0,1426 g Substanz zu 7,3046 g Gesamtgewicht. $d^{20} = 1{,}2760$. Abgelesene Drehung im 1 dcm-Rohr bei 20° und filtriertem Gasglühlicht 0,62° nach links. Mithin:

$$(\alpha)_D^{20} = -24{,}89^\circ \ (\pm 0{,}2^\circ).$$

In Normal-Natronlauge: 0,1344 g Substanz zu 7,5304 g Gesamtgewicht. $d^{20} = 1{,}0420$. Abgelesene Drehung im 1 dcm-Rohr bei 20° und filtriertem Gasglühlicht 0,85° nach links. Mithin:

$$(\alpha)_D^{20} = -45{,}72^\circ \ (\pm 0{,}2^\circ).$$

Auch wurde die spezifische Drehung des Tripeptides in Wasser bestimmt; doch macht diese Bestimmung keinen Anspruch auf allzu große Genauigkeit, da das Tripeptid in Wasser sehr wenig löslich ist, und daher nur eine sehr verdünnte Lösung untersucht werden konnte.

0,0226 g Substanz gelöst zu 15,9562 g Gesamtgewicht. $d^{20} = 1{,}0835$. Abgelesene Drehung im 2 dcm-Rohr 0,13° nach links bei 20° und filtriertem Gasglühlicht. Mithin:

$$(\alpha)_D^{20} = -9{,}12^\circ.$$

c) Kupfersalz des d-Alanyl-l-leucyl-d-isoleucins.

$(C_{15}H_{28}O_4N_3)_2 . Cu$

0,2 g d-Alanyl-l-leucyl-d-isoleucin wurden mit überschüssiger Kupferoxydaufschlämmung gekocht. Nach zweistündigem Kochen wurde das überschüssige Kupferoxyd abfiltriert. Das violett gefärbte Filtrat wurde auf dem Wasserbade eingedampft.

Das Kupfersalz ist in Methylalkohol löslich.

0,0678 g Kupfersalz (über P_2O_5 bei 140° getrocknet) gaben 0,0078 g Cu.

$(C_{15}H_{28}O_4N_3)_2 . Cu$:

Ber. Cu 9,21 Proz. Gef. Cu 9,19 Proz.

4. Glycyl-d-alanyl-l-leucyl-d-isoleucin.

a) Chloracetyl-d-alanyl-l-leucyl-d-isoleucin.

$$CH_2 . Cl . CO . NH . CH . (CH_3) . CO . NH . CH . CH_2 . CH . (CH_3)_2 CO . NH . CH . (COOH) CH \begin{cases} CH_3 \\ C_2H_5 \end{cases}$$

2,4 g d-Alanyl-l-leucyl-d-isoleucin wurden in 7,9 ccm Normal-Natronlauge gelöst und mit 1,4 g (1,5 Mol.) Chloracetylchlorid und 7,9 ccm Normal-Natronlauge gekuppelt. Das Chloracetylchlorid war in 4 ccm absolutem Äther gelöst.

Aus der Reaktionsflüssigkeit wurde der Chlorkörper des Tetrapeptides nach Ansäuern mit viel Äther ausgeschüttelt, die vereinigten Ätherauszüge unter vermindertem Druck eingedampft und der zurückbleibende Chlorkörper viermal mit Petroläther eingedampft.

Der genannte Chlorkörper wurde in 20 ccm absolutem Alkohol gelöst, mit Tierkohle entfärbt, filtriert und auf dem Wasserbade eingeengt. Es wurde

schließlich Wasser bis zur in der Hitze bleibenden Trübung zugegeben. Auf dem Wasserbade wurde langsam erkalten gelassen. Die Flüssigkeit erstarrte zu einer kristallinischen Masse. Dieselbe wurde abgesaugt, die Mutterlauge eingedampft und der kleine Rest direkt zur Amidierung verwandt.

Die Ausbeute an umkristallisiertem Chlorkörper betrug 2,2 g (75 Proz.). Der Chlorkörper ist in Alkohol sehr leicht löslich, in Wasser ziemlich schwer, in Äther und Essigäther löslich. Aus Essigäther scheidet er sich beim Erkalten ölig ab.

Der Körper sintert bei 189° und ist bei 197° (korr.) klar geschmolzen.

Zur Analyse wurde er über Phosphorpentoxyd bei 80° getrocknet.

0,1241 g Substanz gaben 0,2371 g CO_2 und 0,0860 g H_2O.

0,1560 g Substanz gaben 14,5 ccm N bei 21° und 756 mm Druck.

$C_{17}H_{30}N_3O_5Cl$:

Ber.	C	52,11	H	7,66	N	10,73 Proz.
Gef.	C	52,10	H	7,75	N	10,74 -

Zur optischen Bestimmung wurde in absolutem Alkohol gelöst.

0,1912 g Substanz zu 5,8051 g Gesamtgewicht. $d^{20} = 0{,}8106$. Abgelesene Drehung im 1 dem-Rohr bei 20° und filtriertem Gasglühlicht 1,44° nach links. Mithin:

$$(\alpha)_D^{20} = -54{,}83^\circ \ (\pm 0{,}2^\circ).$$

b) Glycyl-d-alanyl-l-leucyl-d-isoleucin.

$CH_2(NH_2) . CO . NH . CH(CH_3) . CO . NH . CH . (C_4H_9)CO . NH . CH . (COOH) . CH\begin{matrix}CH_3\\C_2H_5\end{matrix}$

1,7 g Chloracetyl-d-alanyl-l-leucyl-d-isoleucin wurden mit 50 ccm 25 proz. wässerigen Ammoniak bei 37,5° 7 Tage stehen gelassen.

Die resultierende Lösung wurde im Vakuum zur Trockne verdampft und dreimal mit absolutem Alkohol eingedampft. Der Rückstand wurde dann mit 96 proz. Alkohol ausgekocht, das zurückbleibende Tetrapeptid abgesaugt und zur Entfernung des letzten Restes Chlorammoniums mit wenigen Kubikzentimeter Wasser gewaschen. Es gelang mir auf diese Weise 1,0 g reines Tetrapeptid zu erhalten.

Die alkoholische Mutterlauge und das Waschwasser wurden vereinigt, eingedampft, in Wasser aufgenommen und das Chlorammonium mit Silbersulfat quantitativ entfernt. Nur noch eine geringe Menge Tetrapeptid (0,1 g) wurde so gewonnen.

Das Tetrapeptid ist in absolutem Alkohol schwer löslich. In verdünntem Alkohol ist es löslich, in Wasser ziemlich schwer löslich; in Essigäther, Benzol, Chloroform und Methylalkohol ist es sehr schwer löslich, in Äther und Petroläther unlöslich.

Umkristallisiert wurde es genau wie das Tripeptid aus absolutem Alkohol unter Zusatz von 6 ccm 25 proz. Ammoniak. Das Tetrapeptid schied sich, nachdem das Ammoniak weggekocht war, beim Erkalten in Nädelchen aus.

Das Glycyl-d-alanyl-l-leucyl-isoleucin sintert beim Erhitzen im Kapillarröhrchen bei 231°; es beginnt zu schmelzen bei 247° und ist bei 251° (korr.)

unter Zersetzung und Bräunen geschmolzen. Es gibt sehr deutliche, starke Biuretreaktion.

Zur Analyse wurde es bei 160° über Phosphorpentoxyd getrocknet.

0,1398 g Substanz gaben 0,2754 g CO_2 und 0,1092 g H_2O.

0,1457 g Substanz gaben 18,9 ccm N bei 20° und 756 mm Druck:

	$C_{17}H_{32}N_4O_5$:		
Ber.	C 54,84	H 8,60	N 15,05 Proz.
Gef.	C 53,72	H 8,68	N 15,08 -

Zur optischen Bestimmung wurde es in Normal-Salzsäure und Normal-Natronlauge gelöst.

In Normal-Salzsäure: 0,0726 g Substanz gelöst zu 7,6334 g Gesamtgewicht. $d^{20} = 1{,}0160$. Abgelesene Drehung im 1 dcm-Rohr bei 20° und filtriertem Gasglühlicht 0,78° nach links. Mithin:

$$(\alpha)_D^{20} = -80{,}59^\circ \ (\pm 0{,}2^\circ).$$

In Normal-Natronlauge: 0,0856 g Substanz gelöst zu 7,8836 g Gesamtgewicht. $d^{20} = 1{,}0450$. Abgelesene Drehung im 1 dcm-Rohr bei 20° und filtriertem Gasglühlicht 0,89° nach links. Mithin:

$$(\alpha)_D^{20} = -78{,}44^\circ \ (\pm 0{,}2^\circ).$$

c) Kupfersalz des Glycyl-d-alanyl-l-leucyl-d-isoleucins.

$(C_{17}H_{31}N_4O_5)_2 . Cu$

0,2 g Glycyl-d-alanyl-l-leucyl-d-isoleucin wurden mit Kupferoxydaufschlämmung im Überschuß 2 Stunden gekocht. Das überschüssige Kupferoxyd wurde abfiltriert, das blau gefärbte Filtrat auf dem Wasserbade eingeengt.

Das hellblau gefärbte Kupfersalz ist in Methylalkohol löslich.

0,0762 g Kupfersalz gaben 0,0074 g Cu O.

$(C_{17} H_{31} N_4 O_5)_2 . Cu$:

Ber. Cu 7,97 Proz. Gef. Cu 7,75 Proz.

VI. Versuche über die Spaltung der optisch-aktiven Polypeptide mit Hefepreßsaft.

1. l-Leucyl-d-isoleucin.

0,1226 g l-Leucyl-d-isoleucin wurden in 5 ccm Wasser gelöst; die Lösung ist $^1/_{10}$ molekular.

4 ccm dieser Lösung wurden mit 1 ccm Hefepreßsaft versetzt und das Drehungsvermögen untersucht.

Die Drehung nahm ab:

3. VIII. 10	10.30 h	abgelesener	Winkel	+ 0,10°
	11.30 h	-	-	+ 0,09°
	12.30 h	-	-	+ 0,07°
	3.00 h	-	-	+ 0,03°
	7.00 h	-	-	+ 0,03°
4. VIII. 10	10.30 h	-	-	+ 0,03°

2. d-Alanyl-l-leucyl-d-isoleucin.

7 ccm einer bei 37,5° gesättigten wässerigen Lösung von d-Alanyl-l-leucyl-d-isoleucin wurden mit 1 ccm Hefepreßsaft versetzt. Die Lösung wurde optisch untersucht.

Die Drehung nahm zuerst zu, dann wieder ab:

3. VIII. 10	10.30 h	abgelesener	Winkel	$-0{,}05^\circ$
	11.30 h	-	-	$+0{,}02^\circ$
	12.45 h	-	-	$+0{,}02^\circ$
	3.15 h	-	-	$+0{,}01^\circ$
	7.00 h	-	-	$+0{,}01^\circ$
4. VIII. 10	10.30 h	-	-	$+0{,}01^\circ$

Vorliegende Arbeit wurde im Physiologischen Institut der Königl. Tierärztlichen Hochschule zu Berlin im Oktober 1908 begonnen und im August 1910 abgeschlossen.

In der Zeit von Juli 1909 bis April 1910 mußte die Arbeit wegen Krankheit unterbrochen werden.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. med. Emil Abderhalden bin ich für die Anregung zu dieser Arbeit sowie für das ständige Interesse an derselben und die dauernde Unterstützung mit Rat und Tat zu sehr großem Danke verpflichtet.

Ihm sei auch an dieser Stelle mein herzlichster Dank ausgesprochen.

Lebenslauf.

Ich, Paul Hirsch, evangelischen Bekenntnisses, Preuße, wurde am 6. Mai 1885 als Sohn des Bankdirektors Ernst Hirsch und seiner verstorbenen Ehefrau Auguste geb. Roos in Wiesbaden geboren.

Ostern 1891 trat ich in die Vorschule der Oberrealschule zu Wiesbaden ein, die ich Ostern 1904 mit dem Zeugnis der Reife verließ.

Herbst 1904 bezog ich die Universität Marburg an der Lahn, um mich dem Studium der Chemie zu widmen. Am 3. Dezember 1907 bestand ich daselbst das Verbandsexamen in anorganischer und organischer Chemie.

Herbst 1908 begab ich mich nach Berlin, um dort meine Studien zu beenden. Am 8. Dezember 1910 bestand ich die Promotionsprüfung.

Meine akademischen Lehrer waren:

Zu Marburg: Brauer, Fries, Korschelt, Richarz, Schaum, Schenck, Straub, Zincke.

Zu Berlin: Abderhalden, Börnstein, Hahn.

Allen meinen verehrten Lehrern sage ich an dieser Stelle herzlichsten Dank.